

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07344

研究課題名（和文）血小板の産業的生産に向けた巨核球成熟のシングルセルアプローチ

研究課題名（英文）Single cell analysis of maturing megakaryocytic cell line to enhance the platelet productivity for industrialization

研究代表者

曽根 正光（Sone, Masamitsu）

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90599771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは以前に人工多能性幹細胞（iPS細胞）を分化することで得られた巨核球株に増殖を促進する遺伝子を導入し、不死化巨核球株imMKCLを作製していた。培養条件を変えるとimMKCLは成熟を開始し、proplateletと呼ばれる突起を伸ばして血小板を放出するが、その割合は低く、proplateletを形成するのは一部の細胞に限られていた。今回、proplateletを形成する細胞とそうではない細胞の間で網羅的な遺伝子発現の比較解析をシングルセルレベルで行い、両者の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板製剤は止血が必要となる様々な局面で使用される不可欠な医療製剤であるが、現在は献血のみに依存している。また、使用期限が4日と短いことから将来において供給の不安定化が懸念される。私たちはこうした問題に対処するため人工血小板の産業的生産を目指して不死化巨核球株imMKCLを樹立した。しかし、imMKCLは成熟が不均一で一部の細胞しか血小板を放出しないことが、人工血小板の産業化を妨げている。今回の研究成果は、その不均一性の原因を解明する手がかりを与えるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Our group had previously established an immortalized megakaryocytic cell line (imMKCL) by introducing proliferation activating genes into megakaryocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Upon changing the culture condition, imMKCLs start maturation to form protrusions called proplatelets and finally produce platelets. However, the proportion of imMKCLs that form proplatelet is low. In this study, I compared gene expression profiles of proplatelet-positive imMKCLs with negative ones at single-cell level and revealed the differences between them.

研究分野：分子生物学

キーワード：血小板 シングルセル 巨核球 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 少子高齢化に伴うドナー不足や血小板不応症に対処するため、私たちは iPS 細胞技術に基づく人工血小板製造システムの構築を目指している。これまでに iPS 細胞から血小板前駆細胞である巨核球を分化誘導したのち、不死化した細胞株 imMKCL を樹立した (*Cell Stem Cell*, 2014)。この imMKCL 株は、ドキシサイクリン (Dox) と呼ばれる薬剤存在下では旺盛に増殖し、Dox を除去することによって速やかに終末分化を開始し、5 日間で血小板を放出するというマスターストック細胞として優れた性質を持つ。

(2) しかしながら、imMKCL の血小板生産性は生体内におけるそれと比較して 10 分の 1 から 100 分の 1 程度と低く、産業化を目指す上で大きな障壁となっている。その主たる原因が、imMKCL 株内に存在する成熟の不均一性である。巨核球が血小板放出に至るまでに多核化、細胞体サイズの増大、細胞膜の肥大、proplatelet (胞体突起) の形成という一連の成熟過程を経るが、Dox を除去した後に proplatelet の形成に至る imMKCL 細胞の割合は全細胞集団の 10% 未満に過ぎず、本来有するであろう血小板産生能力を十分に活かし切ることができていない。

2. 研究の目的

(1) imMKCL に終末分化を誘導しても大多数の細胞が proplatelet を形成せず、ごくわずかな細胞だけが proplatelet 形成を行い、血小板を放出するという成熟の不均一性の原因は細胞を集団で捉えて解析しても突き止めることは困難である。

(2) 一方、細胞集団中の個別の細胞の性質を解析する上で非常に強力なツールとなる FACS を用いるためには、終末分化をしている細胞とそうではない細胞を区別することのできる細胞表面マーカーが必要であるが、現状においてそのような細胞表面マーカーは知られていない。例えば、巨核球細胞が分化成熟する過程で発現をすることが知られる CD42b 抗原は、確かに Dox 除去前の imMKCL 細胞には発現がほとんど見られず、Dox 除去後に発現を開始することから、巨核球の分化レベルを知る上で有用なマーカーと言える。しかしながら、CD42b を発現したとしても大多数の imMKCL 細胞はその後血小板を放出することがないことから、CD42b の発現上昇は多段階からなる巨核球成熟過程の初期段階を反映しているに過ぎず、終末分化の指標に相応しいとは言えないのである。

(3) そこで、本研究では、現状においてもっとも信頼性のある終末分化の指標として、proplatelet 形成という形態学的特徴に着目し、血小板を生み出すことのできる細胞とそうでない細胞についてシングルセルレベルでの発現比較解析を行うことで上述のような imMKCL 成熟の不均一性の根本原理を理解することを目的とした。これにより人工血小板の産生効率を飛躍的に向上させることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

培養皿底面に 200 μ m 四方のマイクロラフト構造が敷き詰められた QIAscult (キアゲン) という装置の上に Dox 除去後 3 日目の imMKCL を低密度で播種した。翌日、細胞形態を詳細に観察するため、巨核球の細胞表面マーカー CD41 で染色し、17 個の proplatelet 陽性と 12 個の proplatelet 陰性のシングルセルを、顕微鏡下でマイクロラフトごと分取し、次に SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (タカラバイオ) により cDNA の合成と増幅を行い、HiSeq2000 (イルミナ) を用いた RNA-seq により発現比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) QIAscult を用いたシングルセル発現解析の条件検討

まず、QIAscult を利用することで顕微鏡下での imMKCL 株の形態情報に基づいて遺伝子発現比較解析をすることが可能であるか、以下のように検討した。血小板の分化マーカーとして知られる *TUBB1* 遺伝子に GFP を繋いだレポーターを有する imMKCL 株 (*Blood Advances*, 2018) を QIAscult 上に播種し、翌日顕微鏡下で GFP の輝度が強い細胞と弱い細胞をそれぞれ分取し RT-qPCR により *TUBB1* 遺伝子の発現を定量した (図 1)。その結果、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* では両細胞群で発現レベルに差が見られなかったが、*TUBB1* は GFP の輝度が高い細胞群の方が 30 倍以上 *TUBB1* の発現が高かったことから、本研究手法が有効であることが示唆された。

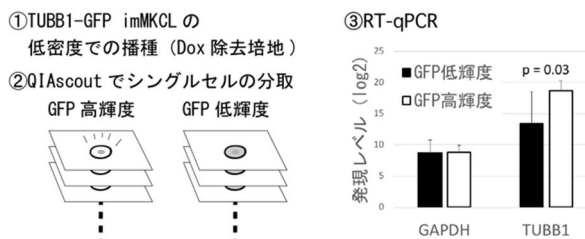


図 1 顕微鏡下で分取したシングルセルの RT-qPCR による発現解析

その結果、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* では両細胞群で発現レベルに差が見られなかったが、*TUBB1* は GFP の輝度が高い細胞群の方が 30 倍以上 *TUBB1* の発現が高かったことから、本研究手法が有効であることが示唆された。

(2)網羅的シングルセル発現解析

Dox を除去することにより成熟を開始してから 3 日目に Q1Ascout 上に播種し、4 日目の imMKCL についてシングルセルで分取し、RNA-seq を行った。この時、並行して Q1Ascout 上に播種せずに得られたおよそ 100 個の浮遊細胞も RNA-seq 解析に供した。遺伝子発現データを主成分分析にかけ、それぞれの細胞の顕微鏡画像とともにプロットしたものを図 2 に示す。その結果、一部オーバーラップするものの proplatelet 形成陽性細胞（ピンク）と陰性細胞（青）は分離する傾向があった。また、100 個の浮遊細胞から得られた発現データは proplatelet 陰性のシングルセルの集団に近い発現プロファイルを示したことから、Dox を除去してもほとんどの imMKCL 細胞が proplatelet の形成に至らないことと考え合わせると、本解析が proplatelet 陽性細胞の遺伝子発現をその他大多数の占める proplatelet 陰性細胞と比較に有用であることを示唆している。また、Dox 除去後、経時的に取得した imMKCL 集団の RNA-seq データと比較すると、proplatelet の有無と相関を示す遺伝子群は、細胞集団の経時変化をドライブしている遺伝子群とは異なっていた。すなわち、Dox 除去により細胞増殖因子の発現が低下することで自然と引き起こされる転写カスケードとは異なる分子機構によって、proplatelet 形成とそれに続く血小板産生が制御されている可能性を示唆している。驚くべきことに proplatelet 形成陽性細胞で発現が高い遺伝子群の中には細胞内の鉄イオンの挙動を制御するタンパク質をコードするものなどがあり、これまで巨核球において注目されることのない遺伝子が多く見られた。そのようなタンパク質の働きを薬理的に変化させることや模倣することで血小板産生能力に何らかの違いが見られるか検証をしたが、現在のところそのような結果は得られていない。

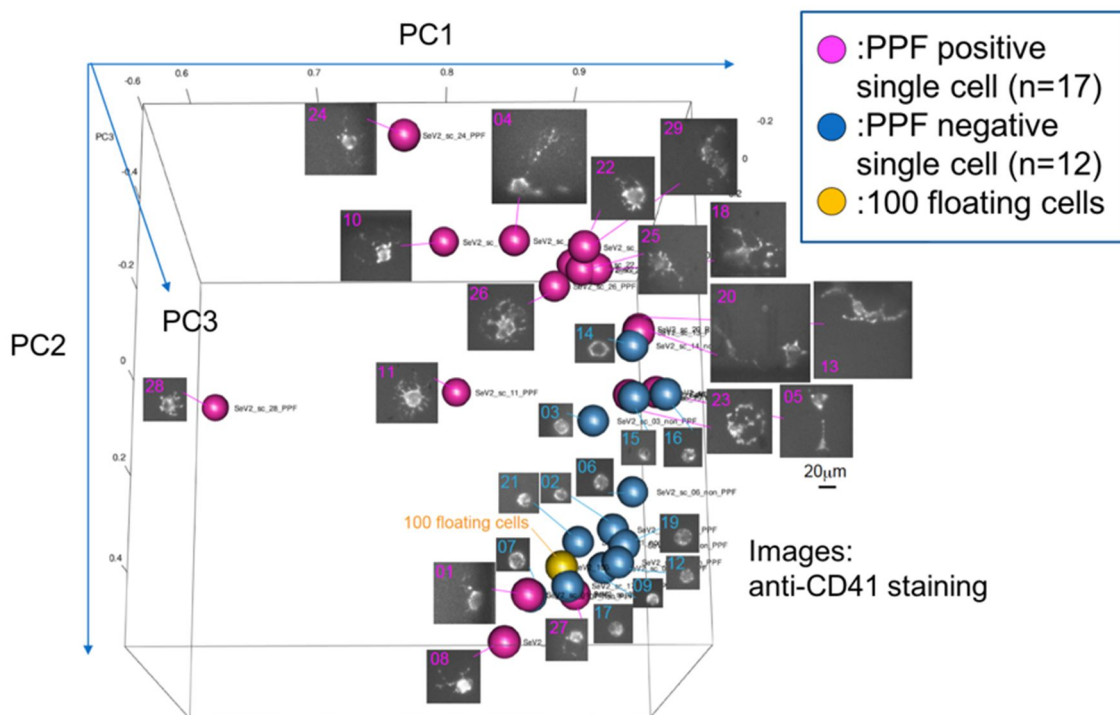


図 2 シングルセル遺伝子発現解析の主成分分析と細胞形態画像のプロット

今後、本研究で得られた proplatelet 形成と相関を示す遺伝子を強制発現することや CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子破壊により発現を阻害することで、imMKCL の血小板産生に重要な役割を果たす遺伝子に迫ることができるものと考えられる。さらに、そうした巨核球成熟メカニズムの根本的な理解は人工血小板の産業的生産の実現に寄与するであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曽根 正光
2. 発表標題 不死化巨核球による血小板産生過程のマルチオミクス解析
3. 学会等名 第6回北大部局横断シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------